

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. April 2003 (10.04.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/029813 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/48**

Bruno [CH/CH]; Haldenstrasse 13, CH-5233 Stilli (CH). **KÜBLER, Eric** [CH/CH]; Marschalkenstrasse 37, CH-4054 Basel (CH).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/10681

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. September 2002 (24.09.2002)

(74) Anwalt: **SCHAEFER, Konrad**; Schaefer & Emmel, Gehölzweg 20, 22043 Hamburg (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, CA, JP, NZ, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
101 47 012.6 25. September 2001 (25.09.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **PRIONICS AG** [CH/CH]; Wagistrasse 27a, CH-8952 Schlieren (CH).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

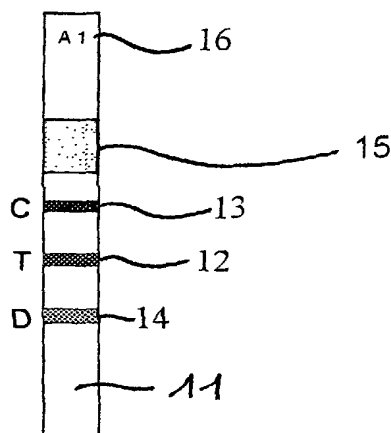
(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **PRICE, Paul** [US/CH]; In Stelzenacker 13, CH-8049 Zürich (CH). **OESCH,**

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: TEST STRIPS FOR THE DETECTION OF PRION PROTEINS

(54) Bezeichnung: TESTSTREIFEN FÜR DEN NACHWEIS VON PRIONPROTEINEN



(57) Abstract: The invention relates to a test strip for the detection of an analyte in liquid or homogenised samples, with a section which may be brought into contact with the sample and with at least one first defined region on the test strip in which detection reagents are immobilised which bind the prion protein and a device for the simultaneous testing of several samples in sample containers, composed in a group with a defined geometrical arrangement. The device comprises a holder in which several test strips are fixed in an arrangement corresponding to the defined geometrical arrangement of the sample containers, such that the lower section thereof may be introduced into each of the sample containers.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft einen Teststreifen zum Nachweis eines Analyten in flüssigen oder homogenisierten Proben, mit einem in Kontakt mit der Probe bringbaren Abschnitt und mit mindestens einem ersten abgegrenzten Bereich auf dem Teststreifen, in dem Nachweisreagenzien immobilisiert sind, die das Prionprotein binden sowie eine Einrichtung zum gleichzeitigen

Testen mehrerer Proben in Probengefäßen, die in definierter geometrischer Anordnung in einem Verbund zusammengefasst sind, wobei die Einrichtung einem Halter aufweist, in dem mehrere Teststreifen in einer der definierten geometrischen Anordnung der Probengefäße entsprechenden Anordnung dergestalt sind, dass ihre unteren Abschnitte gleichzeitig in jeweils eines der Probengefäße einsetzbar sind.



WO 03/029813 A2

Teststreifen für den Nachweis von Prionproteinen

Die Erfindung betrifft einen Teststreifen nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1 sowie einen Halter, mit dem mehrere Teststreifen gleichzeitig jeweils in unterschiedliche Probegefäße eingesetzt werden können.

Teststreifen finden Anwendung beim Nachweis einer Vielzahl unterschiedlicher Analyten in flüssigen oder homogenisierten Proben. Auf den Teststreifen ist in der Regel mindestens ein abgegrenzter Bereich vorgesehen, in dem ein Nachweisreagenz für den bestimmten Analyten immobilisiert ist.

Üblicherweise werden die Teststreifen mit einem unteren Abschnitt in Kontakt mit der Probe gebracht. Der abgegrenzte Nachweisbereich befindet sich entweder im unteren Abschnitt des Teststreifens und wird dann direkt von der Probe benetzt. Eine weitere Möglichkeit ist, den Nachweisbereich weiter oberhalb auf dem Teststreifen vorzusehen, wobei dann allerdings der Streifen aus einem flüssigkeitsleitenden Material hergestellt ist und die Probeflüssigkeit aufgrund von Kapillarwirkung von dem Kontaktabschnitt zu dem Nachweisbereich fließen kann.

Ob ein Nachweis positiv oder negativ ist, kann z. B. durch eine Verfärbung im Nachweisbereich beobachtet werden.

Üblicherweise werden Teststreifen vor allem für solche Nachweise eingesetzt, die besonders gut standardisierbar sind bzw. die von ansonsten nicht kundigen Personen selbst zu Hause etc. durchgeführt werden können. Bekannte Beispiele sind z. B. Schwangerschaftstests oder Teststreifen zur Überprüfung der Nierenfunktion.

Ein Nachweis von Prionproteinen erfordert dagegen äußerst aufwendige Vorbereitungen, die bislang ausschließlich von hochspezialisiertem Personal in Sicherheitslaboren durchgeführt werden. Die eigentliche Nachweisreaktion, die üblicherweise für jede Probe einzeln erfolgt stellt im Vergleich zu der Probenvorbereitung nur einen geringen Aufwand dar und man hat bislang daher nicht gezielt über eine Standardisierung und Vereinfachung nachgedacht.

Andererseits ist natürlich im Hinblick auf die wachsende Zahl von Untersuchungen an z. B. Schlachtvieh nicht auszuschließen, daß eine Standardisierung auch der Reaktion zum Nachweis von Prionproteinen nicht doch erhebliche Einsparungen sowohl an Arbeit als auch Kosten bringen könnte.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, eine Einrichtung zur Verfügung zu stellen, mit der sich Prionen in flüssigen oder verflüssigten, bzw. homogenisierten Proben deutlich einfacher als bislang nachweisen lassen. Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, eine Einrichtung zu schaffen, mit der sich die gleichzeitige Messung mehrerer Proben in besonders einfacher Weise durchführen läßt.

Gelöst werden die Aufgaben mit einem Teststreifen, der die kennzeichnenden Merkmale des Anspruches 1 aufweist sowie mit einer Einrichtung, die die kennzeichnenden Merkmale des Anspruches 9 aufweist.

Ähnlich wie bekannte Teststreifen für andere Analyte weist der erfindungsgemäße Teststreifen einen unteren Abschnitt auf, der in Kontakt mit einer flüssigen oder homogenisierten Probe gebracht werden kann, wobei erfindungsgemäß ein erster abgegrenzter Bereich vorgesehen ist, in dem Antikörper oder andere Nachweisreagenzien immobilisiert sind, die das Prionprotein binden. Geeignete Antikörper sind dem Fachmann aus der Veröffentlichung von "Korth, C. et al.; Nature 1997, Vol 390, Seiten 74-77" bekannt.

Der Teststreifen ist gemäß Anspruch 1 aus saugfähigem Material, insbesondere Nitrozellulose oder Polyvinylidenfluorid (PVDF) hergestellt, so daß ein Flüssigkeitstransport zwischen dem unteren in Kontakt mit der Probe bringbaren Abschnitt und dem ersten abgegrenzten Bereich möglich ist.

Für einen üblichen Nachweis mit dem erfindungsgemäßen Teststreifen wird die Probe zunächst mit einem Nachweisreagenz wie z.B. Antikörpern versetzt, die zusammen mit einem Marker einen detektierbaren Komplex mit dem Prionprotein bilden. Für die Detektion können Marker wie radioaktive Isotopen, fluoreszierende Substanzen, im UV- oder im sichtbaren Bereich lichtabsorbierende Chromophore etc. verwendet werden. Im letzteren Falle können solche Marker z.B. gefärbte Polymerkugeln wie Latex-Beads, Goldpartikel, Liposomen und Farbstoffpartikel oder dergleichen sein. Grundsätzlich sind alle detektierbaren Marker geeignet, die aktiv oder passiv an Antikörper oder andere Nachweisreagenzien binden oder gebunden werden

können. Der Einfachheit halber werden im Folgenden nur noch Beispiele mit an gefärbte Marker gebundene Antikörper beschrieben.

Dann wird der Teststreifen mit der Probe in Kontakt gebracht und die Probeflüssigkeit wandert über den ersten abgegrenzten Bereich, in dem die dort immobilisierten Nachweisreagenzien das in der Probe enthaltene Prionprotein mit dem daran hängenden farbigen Marker binden. Es kommt zu einer Verfärbung in dem ersten abgegrenzten Bereich, die z.B. mit dem Auge beobachtet werden kann.

Geeignete Nachweisreagenzien sind z.B. Antikörper, Aptamere oder andere spezifische Erkennungsorgane für Prionenproteine.

Zur Überprüfung, ob die Nachweisreaktion überhaupt funktioniert hat, können auf dem Teststreifen ein bzw. mehrere weitere abgegrenzte Bereiche vorgesehen sein, in denen Kontrollreagenzien immobilisiert sind.

In einer bevorzugten Ausgestaltung weist der Teststreifen in diesem Zusammenhang einen zweiten abgegrenzten Bereich auf, in dem Reagenzien immobilisiert sind, die den farbigen Reagenz-Markerkomplex in der Probe binden können. Hiermit kann überprüft werden, ob der Reagenz-Markerkomplex überhaupt der Probe zugesetzt wurde, bzw. ob die Konzentrationen stimmen, etc. Die hierfür verwendeten Kontrollreagenzen können insbesondere ein Antikörper oder ein funktionelles Reagenz sein, die spezifisch den farbigen Reagenz-Markerkomplex nur dann binden, wenn dieser noch explizit an das Prionprotein binden kann. Insbesondere kann als Kontrollreagenz rekombinantes Prionprotein eingesetzt werden.

Eine weitere vorteilhafte Ausgestaltung betrifft Teststreifen, die in Nachweisreaktionen für PrP^{Sc} eingesetzt werden. Es ist bekannt, daß Prionproteine in zwei unterschiedlichen Isoformen vorliegen, die mit PrP^c und PrP^{Sc} bezeichnet werden. PrP^c stellt dabei die Isoform eines normalen Säugetierproteins dar, während PrP^{Sc} eine abnorme, pathologische Isoform ist.

Es wird zur Zeit davon ausgegangen, daß PrP^{Sc} spezifisch für Prionenkrankheiten ist. Übliche Tests und Nachweisverfahren gehen daher von PrP^{Sc} als Krankheitsmarker aus und überprüfen insbesondere die Anwesenheit dieses Moleküls in Proben.

Problematisch ist dabei in der Regel, daß Proben aus infizierten Quellen nicht ausschließlich PrP^{Sc} sondern auch PrP^c enthalten. Im Nachweisverfahren muß daher eine Differenzierung zwischen dem üblicherweise vorliegenden PrP^c und dem eventuell vorliegenden PrP^{Sc} erfolgen.

Zur Differenzierung wird zur Zeit eine Protease-Verdauung der Probe durchgeführt, wobei man sich zu Nutze macht, daß die PrP^c-Form vollständig verdaubar ist, während bei der PrP^{Sc}-Form nur ein N-terminaler Bereich Protease-sensitiv ist und ein als PrP 27-30 bezeichneter Bereich nicht verdaut wird.

Bei einem speziellen Nachweis von PrP^{Sc} werden daher bei einem erfindungsgemäßen Teststreifen im ersten abgegrenzten Bereich Antikörper immobilisiert, die speziell PrP 27-30 binden, wobei natürlich nicht ausgeschlossen werden kann, daß bei unvollständiger Verdauung auch ein entsprechender Bereich der PrP^c-Form gebunden würde.

Um hier Sicherheit zu haben, kann in einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung bei dem erfindungsgemäßen Teststreifen ein dritter abgegrenzter Bereich

vorgesehen sein, in dem Kontrollreagenzien immobilisiert sind, die spezifisch den N-Terminus des PrP-Proteins erkennen und binden. Bei einer vollständigen Verdauung sollte kein N-terminaler Bereich von PrP mehr nachweisbar sein. Findet dagegen in diesem dritten Bereich eine Verfärbung statt, so spricht dies dafür, daß noch intaktes PrP^c in der Probe vorliegt und daß demzufolge die Verdauung nicht vollständig war. Geeignete Kontrollreagenzien können z.B. die aus der Veröffentlichung von "Barry, R.A. et al.; J. Immunol. 1988, Vol. 140, Seiten 1188-1193" bekannten Antikörper sein.

Mit dieser Ausgestaltung läßt sich in besonders einfacher Weise bereits gleichzeitig mit dem Prionennachweis überprüfen, ob die Verdauung vollständig war oder nicht, wofür bei den bislang gängigen ELISA-Verfahren immer ein zusätzlicher Ansatz erforderlich wäre.

Auf dem erfindungsgemäßen Teststreifen kann weiterhin ein als Waste-Pad bezeichneter Bereich vorgesehen sein, der die durch den Streifen durchgelaufene Flüssigkeit aufnimmt. In diesem Bereich kann z.B. eine saugfähige Matte, bzw. ein Vlies oder auch Löschpapier oder dergleichen vorgesehen sein. Die Ausgestaltung des Teststreifens kann in Form und Tiefe derart erfolgen, dass eine kleine Chromatographiesäule entsteht, die es erlaubt, PrP auch aus größeren Volumina zu trennen und nachzuweisen.

Die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Teststreifen mit Waste-Pad sind bevorzugt aus saugfähigem Material hergestellt, damit die Flüssigkeit aus der Probe über die gegebenenfalls unterschiedlichen Nachweis- und Kontrollbereiche fließen kann.

Denkbar wäre selbstverständlich auch, Teststreifen zu verwenden, die nicht aus saugfähigem Material bestehen. Hierzu müßten dann allerdings die abgegrenzten Nachweis- und ggf. vorgesehen Kontrollbereiche so auf dem Teststreifen vorgesehen werden, daß sie direkt mit der Probe benetzt werden können oder die Flüssigkeit muss aktiv (z.B. durch Saugen oder Zentrifugieren) bewegt werden.

Die Erfindung betrifft nicht nur die erwähnten Teststreifen, sondern auch eine Einrichtung zum gleichzeitigen Testen mehrerer Proben.

Üblicherweise erfolgt die gleichzeitige Aufarbeitung mehrerer Proben in Mikrotiterplatten oder sonstigen Formaten, in denen mehrere Probengefäße in definierter geometrischer Anordnung in einem Verbund zusammengefaßt sind.

Die bevorzugte erfindungsgemäße Einrichtung weist demnach einen Halter auf, in dem mehrere Teststreifen dergestalt angeordnet und ausgerichtet aufgenommen sind, daß ihre unteren Abschnitte gleichzeitig in jeweils eines der Probengefäße des verwendeten Verbunds einsetzbar sind.

Denkbar wäre z. B. ein streifenförmiger Halter, an dem die Teststreifen parallel und jeweils in einem Abstand zueinander befestigt sind, der dem jeweiligen Abstand der Probengefäße in einer Reihe einer Mikrotiterplatte entspricht.

Eine weitere Ausgestaltung der Erfindung sieht einen Halter vor, der gleichzeitig alle für ein bestimmtes Format erforderlichen Teststreifen aufnimmt. Denkbar wäre z. B. ein Halter für eine Mikrotiterplatte, in dem eine der Probengefäße(Kavitäten)anzahl entsprechende Anzahl von Teststreifen aufgenommen ist.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung könnte eine solche Einrichtung z.B. einen Rahmen aufweisen, in den für jede Reihe der Mikrotiterplatte ein streifenförmiger Halter mit einer entsprechenden Anzahl von Teststreifen einsetzbar ist. Zum Ablesen der Ergebnisse können die Halter nacheinander aus dem Rahmen entnommen werden, was die Auswertung erleichtert.

Im Folgenden soll die Erfindung anhand mehrerer Abbildungen, die unterschiedliche Ausführungsbeispiele zeigen näher erläutert werden. Weitere Abbildungen zeigen die Ergebnisse von Untersuchungen mit den erfindungsgemäßen Teststreifen.

Dabei zeigt:

- Fig. 1 einen Teststreifen;
- Fig. 2 eine Ausführung eines Halters, in dem mehrere Teststreifen parallel zueinander in einer Reihe befestigt sind;
- Fig. 3 einen Rahmen im üblichen Mikrotiterplattenformat, in den die in Fig. 2 gezeigten Halter einsetzbar sind;
- Fig. 4 einen vollständig mit Haltern gemäß Fig. 2 bestückten Rahmen gemäß Fig. 3;
- Fig. 5 die Ergebnisse einer Untersuchung, bei der mehrere in einem wie in Fig. 2 gezeigten Halter befestigte Teststreifen zur Detektion von rekombinantem bovinem Prionprotein unterschiedlicher Konzentrationen eingesetzt wurden;
- Fig. 6 die Ergebnisse einer Untersuchung mit mehreren Teststreifen zur Detektion von zellulärem Prionprotein in transgenen Mäusen und Wildtypen;

- Fig. 7 die Ergebnisse einer Untersuchung, mit zwei Teststreifen zur Detektion von krankheitsspezifischem, Protease-resistentem Prionprotein; und
- Fig. 8 die Ergebnisse einer Untersuchung mit drei Teststreifen zur Kontrolle der Verdauungsbedingungen von BSE-Homogenat.

Fig. 1 zeigt einen Teststreifen 10 zum Nachweis von Prionproteinen. Der Teststreifen weist einen unteren Abschnitt 11 auf, der in Kontakt mit einer homogenisierten oder flüssigen Probe bringbar ist.

Weiterhin sind auf dem Teststreifen 10 mehrere abgegrenzte Bereiche 12, 13 und 14 vorgesehen, die jeweils Nachweis- oder Kontrollreagenzien enthalten. Diese Reagenzien können z. B. durch Aufsprühen auf dem Teststreifen 10 aufgebracht werden.

Der Teststreifen 10 besteht aus saugfähigem Material, z. B. Nitrozellulose. Probeflüssigkeit, die im Abschnitt 11 in Kontakt mit dem Teststreifen 10 gelangt, wird durch den Teststreifen entlang der Bereiche 14, 12, 13, bis zu einem Waste-Pad 15 gesaugt, der die durchgelaufene Flüssigkeit aufnimmt. Am oberen Ende des Teststreifens ist eine Identifizierung 16 vorgesehen, die z. B. die Koordinaten der Probe in einer Mikrotiterplatte angibt.

Wie oben bereits angesprochen, sind in den abgegrenzten Bereichen 12, 13, und 14 unterschiedliche Reagenzien fixiert. Zwingend in jedem Teststreifen vorhanden sein müssen Reagenzien, die eventuell in der Probe enthaltenes Prionprotein erkennen. Im gezeigten Fall sind diese Reagenzien, bei denen es sich um spezielle Antikörper gegen das Prionprotein handelt, im abgegrenzten Bereich 12 enthalten.

Der Bereich 13 enthält Kontrollreagenzien, mit denen die Konzentration bzw. das Vorliegen des oben angesprochenen farbigen Nachweisreagenz-Markerkomplexes in der Probe überprüft werden kann.

Der Bereich 14 schließlich enthält Reagenzien, mit denen sich die Verdauung von Prionproteinen überprüfen läßt.

In Fig. 2 ist eine Einrichtung 20 dargestellt, mit der gleichzeitig mehrere Proben analysiert werden können. Die Einrichtung 20 weist einen Halter 21 auf, an dem Teststreifen 10, 10' etc. parallel ausgerichtet mit ihren nach unten weisenden Abschnitten 11 aufgenommen sind. Der Abstand der Streifen 10, 10' zu einander ist so gewählt, daß er z. B. dem üblichen Abstand von Kavitäten in einer Mikrotiterplatte entspricht. Mit dem Halter 21 lassen sich dann gleichzeitig Proben in den Kavitäten einer Reihe einer Mikrotiterplatte überprüfen.

Zwischen den einzelnen Teststreifen 10, 10' können auf dem Halter 21, der im gezeigten Fall die Form eines Streifens aufweist, Perforationen 22 ausgebildet sein, die ein Abtrennen einzelner Teststreifen 10, 10' erleichtern.

Denkbar ist, dieses Format auf die gesamte Mikrotiterplatte zu erweitern.

Hierzu ist in Fig. 3 ein Rahmen 30 dargestellt, dessen Grundfläche so gewählt ist, daß er mit einem Adapter 32 auf eine übliche Mikrotiterplatte aufsetzbar ist und diese dann vollständig abdeckt. Im Bereich der oberen längsverlaufenden Kanten 30 sind jeweils gegenüberliegende Schlitzpaare 31, 31' etc. vorgesehen, in die jeweils ein Halter 21 mit den Teststreifen 10, 10' einsetzbar ist.

Die Anzahl der gegenüberliegenden Schlitzpaare 31, 31' entspricht der Anzahl der Reihen in einer Mikrotiterplatte, so daß für jede Reihe einer Mikrotiterplatte ein Halter 21 eingesetzt werden kann.

Den vollständig eingesetzten Zustand eines solchen Halters 30 zeigt Fig. 4, wobei der Adapter 32 in dieser Darstellung weggelassen wurde.

Die dargestellten Teststreifen enthalten jeweils einen abgegrenzten Bereich 12, 13, 14, die die unterschiedlichen Nachweis- bzw. Kontrollreagenzien enthalten. Die Erfindung soll selbstverständlich auch solche Ausführungen abdecken, bei denen pro Reagenz nicht nur ein sondern mehrere abgegrenzte Bereiche auf dem Teststreifen vorgesehen werden, also z.B. zwei oder mehr abgegrenzte Bereiche, die jeweils Nachweisreagenzien tragen, die in der Probe enthaltenes Prionprotein erkennen, oder zwei oder mehr Bereiche, die Reagenzien zur Überprüfung der Verdauung enthalten etc.

Fig. 5 zeigt die Ergebnisse einer Untersuchung mit mehreren Teststreifen zur Detektion von rekombinantem bovinem Prionprotein (RecBoPrP) unterschiedlicher Konzentrationen. Die Teststreifen wurden mit RecBoPrP verschiedener Ausgangsverdünnungen nach den oben dargestellten Methoden inkubiert. Die Verdünnung der Proben rangiert zwischen 1 : 1 und 1 : 32. Die jeweiligen Verdünnungen sind unter den Teststreifen auf der Figur angegeben. Als 0-Kontrolle wurde ein Teststreifen mit einer Probe inkubiert, die kein RecBoPrP enthielt.

Während der Bereich 13 der Teststreifen, der auf das Vorliegen des Nachweisreagenz-Markerkomplexes in der Probe reagiert, konstant gefärbt ist, weist der Bereich 12 der Teststreifen, der PrP 27-30 erkennt, entsprechend der abnehmenden Konzentration von RecBoPrP jeweils abnehmende

Färbeintensitäten auf. Man erkennt innerhalb des 32-fachen Konzentrationsbereich des RecBoPrP visuell gut unterscheidbare Färbungsintensitäten des Bereichs 12 der Teststreifen. Die Teststreifen lassen sich daher auch zum semiquantitativen Nachweis von RecBoPrP benutzen.

In Fig. 6 sind drei Reihen 60, 60' und 60" mit jeweils mehreren Teststreifen nach Inkubation mit Urin von jeweils vier transgenen Mäusen bzw. Mäusen vom Wildtyp wiedergegeben.

Die Teststreifen weisen wiederum den Bereich 12 auf, der PrP 27-30 erkennt, sowie den Bereich 13, der auf das Vorliegen des Nachweisreagenz-Markerkomplexes in der Probe reagiert.

Die Teststreifen der Reihe 60 wurden mit Urin von vier Wildtyp-Mäusen (WT1-WT4) inkubiert, die normale Mengen an Prionprotein produzieren, was zu einer deutlichen Färbung des Bereichs 12 in den Teststreifen führt.

Die Teststreifen der Reihe 60' wurden mit Urin von vier transgenen Mäusen (Tg20 1- Tg20 4) inkubiert, die stark erhöhte Mengen an Prionprotein produzieren. Dies führt zu einer noch deutlicheren Färbung des Bereichs 12 in den Teststreifen.

Die Teststreifen der Reihe 60" wurden mit Urin von vier transgenen Mäusen (Prnp%1- Prnp%4) inkubiert, die kein Prionprotein produzieren. Der Bereich 12 in den Teststreifen ist daher nicht gefärbt.

Jeweils oberhalb der Teststreifen ist in der Figur die Abkürzung angegeben, die eine Zuordnung des Teststreifens zu der entsprechenden Maus erlaubt.

Man erkennt in der Figur, daß mit Hilfe der beschriebenen Teststreifen das Prionprotein auch in komplexer Umgebung (Urin) spezifisch erkannt wird.

Fig. 7 zeigt Teststreifen A und B, mit denen mit Protease behandeltes Hirnhomogenat einer gesunden und einer an BSE erkrankten Kuh untersucht wurden.

Wie oben erwähnt, wird die nicht infektiöse Isoform des Prionproteins (PrP^c) durch Proteasebehandlung vollständig verdaut, während die infektiöse Isoform (PrP^{Sc}) nur teilweise verdaut wird und eine PrP27-30 genannte Domäne zurücklässt.

Die Teststreifen A und B weisen wiederum jeweils den Bereich 12 auf, der PrP 27-30 erkennt, sowie den Bereich 13, der auf das Vorliegen des Nachweisreagenz-Markerkomplexes in der Probe reagiert.

Der Teststreifen A wurde mit proteasebehandeltem Hirnhomogenat einer gesunden Kuh inkubiert. Der Bereich 12 des Teststreifens bleibt ungefärbt, da das PrP^c vollständig verdaut worden ist.

Der Teststreifen B wurde mit proteasebehandeltem Hirnhomogenat einer an BSE erkrankten Kuh inkubiert. Deutlich ist zu erkennen, daß der Bereich 12 des Teststreifens eine Färbung aufweist. Es ist also trotz Proteasebehandlung PrP 27-30 vorhanden, was darauf schließen läßt, daß die Probe vor dem Verdau PrP^{Sc} enthielt.

Ein Streifentest der hier gezeigten Art eignet sich also zu einem schnellen BSE-Screening von Rinderhirnproben.

Fig. 8 zeigt Teststreifen A, B und C, die mit unterschiedlichen Homogenaten inkubiert wurden, die unterschiedlich gut verdaut wurden.

Die Teststreifen A, B, C weisen neben den Bereichen 12, die PrP 27-30 erkennen, sowie 13, die auf das Vorliegen des Nachweisreagenz-Markerkomplexes in der Probe reagieren, zusätzlich noch Bereiche 14 auf, die den N-terminalen Bereich des Prionproteins binden und damit ausschließlich unverdautes oder unvollständig verdautes Prionprotein erkennen, jedoch nicht verdautes Prionprotein, dem der N-terminale Bereich fehlt.

Teststreifen A wurde mit vollständig verdaulichem proteasebehandeltem Hirnhomogenat einer an BSE erkrankten Kuh inkubiert. Der Bereich 12 ist gefärbt, da das Homogenat PrP27-30 enthält, während der Bereich 14 ungefärbt bleibt, da wegen der vollständigen Verdauung keine N-terminalen Bereiche mehr vorhanden sind.

Teststreifen B wurde mit vollständig verdaulichem proteasebehandeltem Hirnhomogenat einer gesunden Kuh inkubiert. Diese Probe enthält weder PrP 27-30 noch N-terminale Bereiche, so daß die Bereiche 12 und 14 ungefärbt bleiben.

Teststreifen C wurde mit unvollständig verdaulichem proteasebehandeltem Hirnhomogenat einer gesunden Kuh inkubiert. Hier ist der Bereich 12 gefärbt, da das Homogenat wegen des schlechten Verdaus weiterhin die auch in PrP^c enthaltene Domäne PrP 27-30 enthält, während der Bereich 14 gefärbt ist, weil auch N-terminale Bereiche weiterhin vorhanden sind. Ohne den Bereich 14 hätte man nicht sicher differenzieren können, ob die Färbung des Bereichs 12 einen Hinweis auf PrP 27-30 aus einer positiven Probe gibt oder auf eine nicht ausreichende Verdauung von normalem Prionprotein zurückzuführen ist.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Teststreifen zum Nachweis eines Analyten in flüssigen, verflüssigten oder homogenisierten Proben, mit einem in Kontakt mit der Probe bringbaren Abschnitt (11) und mit mindestens einem ersten abgegrenzten Bereich (12) auf dem Teststreifen (10), wobei der Teststreifen (10) aus saugfähigem Material besteht, **dadurch gekennzeichnet**, daß in dem ersten abgegrenzten Bereich (12) Nachweisreagenzien immobilisiert sind, die das Prionprotein spezifisch binden.
2. Teststreifen nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß er aus Nitrozellulose oder PVDF besteht.
3. Teststreifen nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein zweiter abgegrenzter Bereich (13) vorgesehen ist, in dem ein Kontrollreagenz immobilisiert ist, das einen in der Probe befindlichen farbigen Nachweisreagenz-Trägerkomplex bindet.

4. Teststreifen nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß in dem zweiten abgegrenzten Bereich 13 Antikörper gebunden sind, die an die Nachweisreagenzien in dem farbigen Nachweisreagenz-Trägerkomplex binden.
5. Teststreifen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein dritter abgegrenzter Bereich (14) vorgesehen ist, in dem ein Kontrollreagenz immobilisiert ist, mit dem der Erfolg einer eventuellen Verdauung des Prionproteins überprüft werden kann.
6. Teststreifen nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß in dem dritten abgegrenzten Bereich (14) ein Nachweisreagenz immobilisiert ist, das den N-Terminus des Prionproteins erkennt.
7. Teststreifen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß der erste abgegrenzte Bereich (12) zwischen dem zweiten (13) und dritten (14) abgegrenzten Bereich angeordnet ist.
8. Teststreifen mit einem oder mehreren der in den Ansprüchen 1 bis 6 angegebenen abgegrenzten Bereichen, **dadurch gekennzeichnet**, daß die abgegrenzten Bereiche in einem Abschnitt des Teststreifen vorgesehen sind, der bei Kontakt mit der Probe direkt mit Probeflüssigkeit benetzt wird.
9. Einrichtung zum gleichzeitigen Testen mehrerer Proben in Probegefäßen, die in definierter geometrischer Anordnung in einem Verbund zusammengefaßt sind, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Einrichtung einen Halter (21) aufweist, in dem mehrere Teststreifen (10, 10') in einer der definierten geometrischen Anordnung der Probengefäße

entsprechenden Anordnung dergestalt gehalten sind, daß ihre unteren Abschnitte 11 gleichzeitig in jeweils eines der Probengefäße einsetzbar sind.

10. Einrichtung nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Halter (21) in Form eines querverlaufenden Streifens ausgebildet ist, an dem die Teststreifen in rechtem Winkel angeordnet sind.
11. Einrichtung nach einem der Ansprüche 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Rahmen (30) vorgesehen ist, der auf eine übliche Mikrotiterplatte aufsetzbar ist und bei dem im Bereich gegenüberliegender Kanten gegenüberliegende Aufnahmen (31, 31') vorgesehen sind, in die der streifenförmige Halter (21) einsetzbar ist.

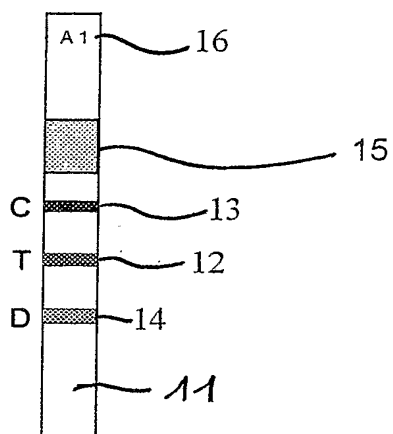


Fig 1

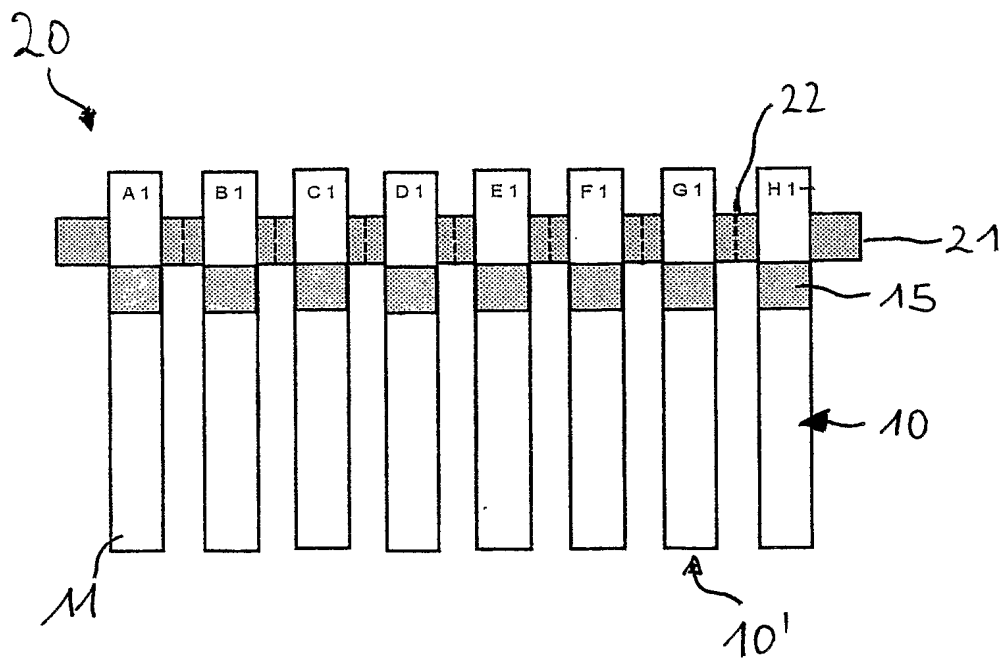


Fig 2

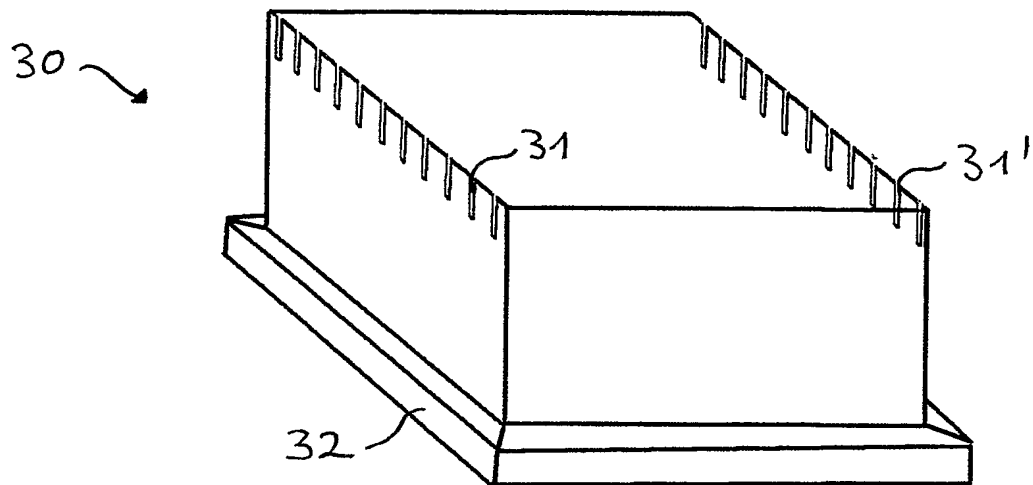


Fig 3

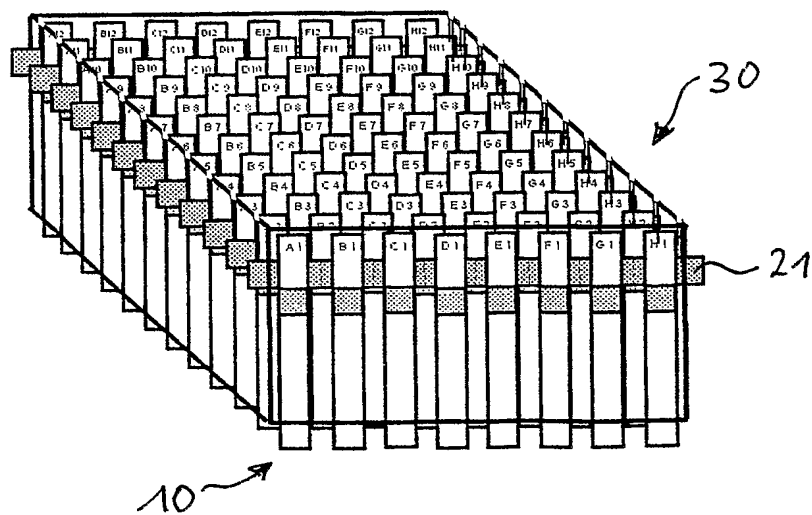


Fig 4

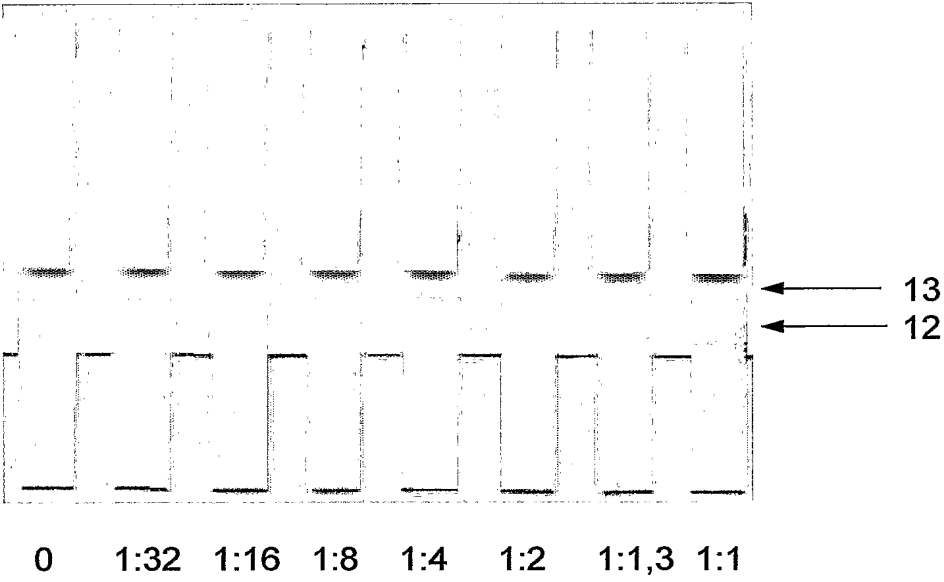


Fig 5

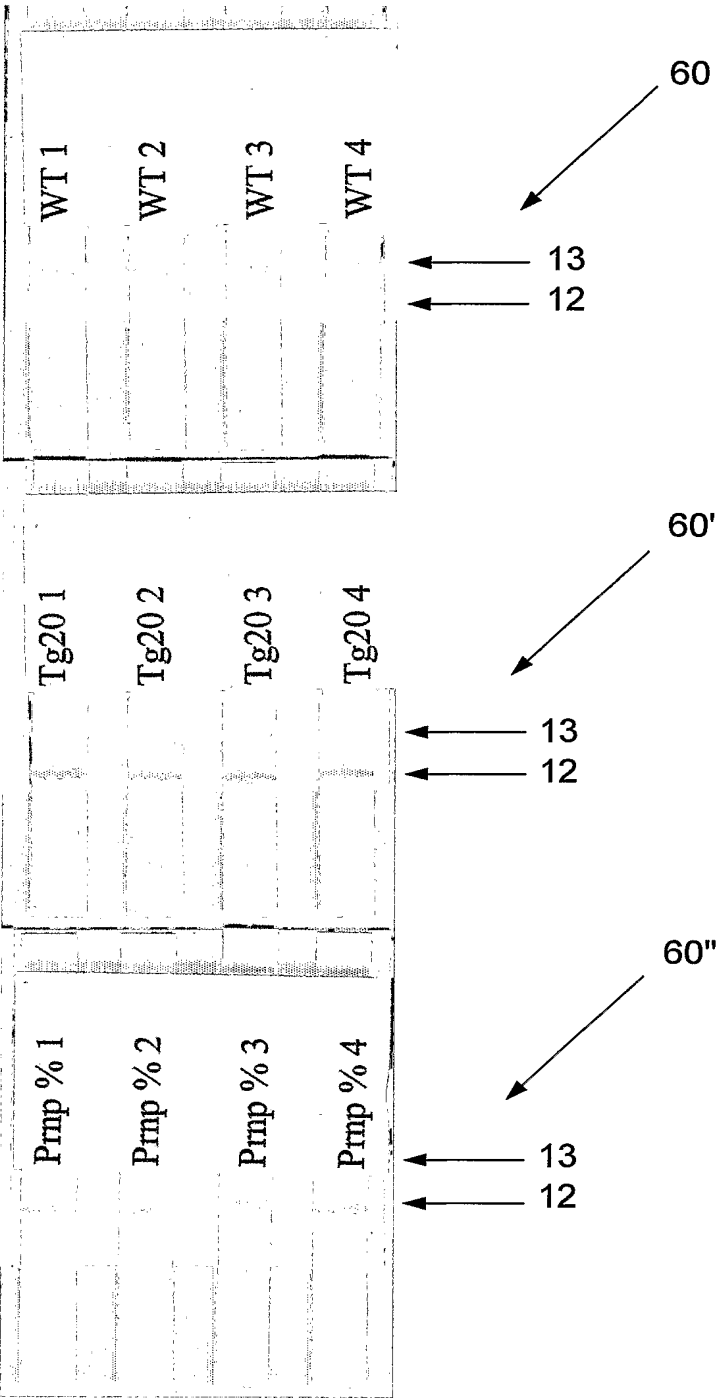


Fig 6

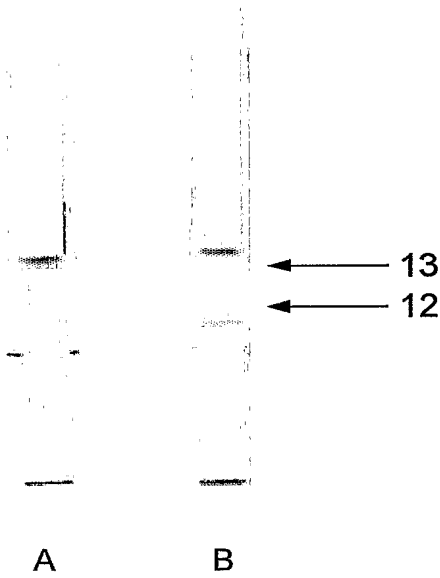


Fig 7

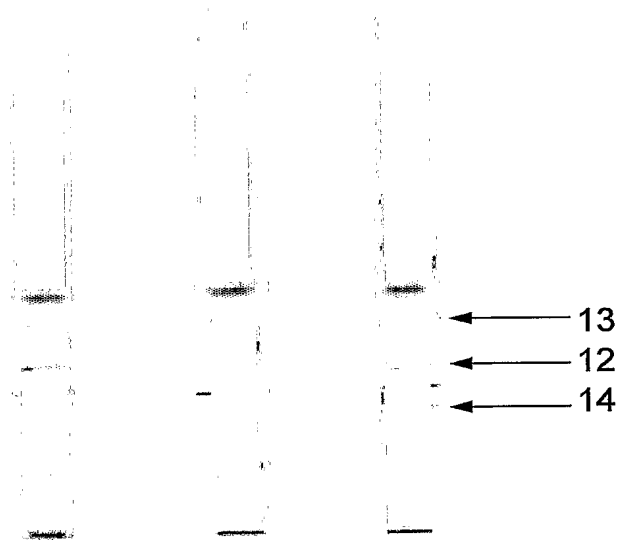


Fig 8